

**Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk
identifikasi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) dan
*Infectious Hypodermal and Haematopoietic
Necrosis Virus* (IHHNV)**



Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Peralatan	2
5 Bahan	2
6 Prosedur kerja	3
Lampiran A (normatif) Penyiapan reagensia	6
 Tabel 1 - Komposisi larutan PCR untuk mendeteksi WSSV.....	 4
Tabel 2 - Komposisi larutan PCR untuk mendeteksi IHHNV	4



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan budidaya serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk identifikasi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) dan *Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus* (IHHNV).

Standar ini disusun oleh Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya, melalui konsensus pada tanggal 6 - 9 Nopember 2006 di Bogor, Jawa Barat yang dihadiri oleh Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

- 1 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.

Standar ini juga telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal 21 Juni 2007 sampai dengan 21 September 2007 dan tahap pemungutan suara pada tanggal 12 Juni 2008 sampai dengan 12 Agustus 2008, namun untuk mencapai kuorum diperpanjang sampai dengan tanggal 12 September 2008 dan langsung disetujui menjadi RASNI.

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk identifikasi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) dan *Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus* (IHHNV)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan prosedur kerja Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk identifikasi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) dan *Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus* (IHHNV).

2 Acuan normatif

Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal, Fourth Edition 2003, Office des Internationale Epizootics (OIE) -2003 p.285-297.

3 Istilah dan definisi

3.1

annealing

proses pelekatan antara *primer* dengan *template*

3.2

denaturasi

proses pemisahan untai ganda DNA

3.3

DNA

asam deoksiribo nukleat, materi genetik yang berada di dalam inti sel organisme hidup

3.4

kontrol negatif

suatu kendali hasil suatu reaksi PCR dengan menggunakan *template* berupa akuades untuk mengetahui terjadinya suatu kontaminasi dari dalam pada pelaksanaan PCR

3.5

kontrol positif

suatu kendali hasil suatu reaksi PCR dengan menggunakan *template* berupa DNA yang sudah diketahui pasti berasal dari organisme target identifikasi

3.6

***Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

reaksi berantai polimerase, merupakan perbanyakan untai DNA panjang tertentu secara *in vitro* menggunakan enzim polimerase

3.7

primer

suatu oligonukleotida (nukleotida dengan panjang basa antara 20 - 30) digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

3.8

sentrifus

alat pemusing, untuk mengendapkan partikel dengan berat molekul rendah dengan cara pemutaran pada kecepatan tinggi

3.9

supernatan

cairan jernih berada pada lapis atas setelah suatu larutan disentrifuse

3.10

template

cetakan, berupa oligonukleotida dengan panjang nukleotida antara 20 - 30, disalin dari satu DNA suatu organisme yang akan dilakukan perbanyakan secara laboratorium

4 Peralatan

- a) *fume hood*;
- b) sentrifuse;
- c) *vortex mixer*;
- d) *waterbath/heating block*;
- e) mikropipet;
- f) *laminar flow horizontal (biohazard)*;
- g) *thermal cycler*;
- h) elektroforesis horizontal;
- i) *uv transilluminator*;
- j) kamera;
- k) *autoclave*;
- l) pH meter;
- m) timbangan mikro (ketelitian 0,01 g);
- n) *hot plate*;
- o) *separating funnel*;
- p) kulkas;
- q) *magnetic stirrer*;
- r) *pestle*.

5 Bahan

- a) larutan *saturated phenol* (p.a);
- b) *proteinase K* (10 mg/ml);
- c) *ribonuklease* (0,2 mg/ml);
- d) *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 1 %;
- e) *chloroform*: isoamyl alkohol (24:1 v/v);
- f) alkohol 70 % (p.a);
- g) alkohol absolut (p.a) disimpan pada suhu -20 °C;
- h) alkohol 95 % (p.a);
- i) *nuclease free water*;
- j) 10 x *PCR buffer*;
- k) 50 mM $MgCl_2$;
- l) 200 μM dNTPmix;
- m) *taq DNA polymerase* (5U/ μL);
- n) 2 set *primer* (100 pmol):
146F1=5'-ACT ACT AAC TTC AGC CTA TCT AG-3'
146F2=5'-GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A-3'

146R1=5'-TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A-3'

146R2=5'-TAC GGC AGC TGC TGC CAG TTG T-3'

- o) larutan tris-HCl;
- p) 0,5 M EDTA pH 8;
- q) *agarose*;
- r) *ethidium bromide* (10 mg/ml);
- s) *loading buffer*;
- t) larutan TBE (*Tris Boric EDTA*);
- u) 100 bp DNA *ladder*;
- v) akuades;
- w) akuabides;
- x) sarung tangan *disposable*;
- y) M-cresol;
- z) 2-mercaptoethanol;
- aa) 8-hydroxyquinoline;
- bb) NaOH;
- cc) *boric acid*;
- dd) *disposable microtube* steril 1,5 ml dan 0,2 ml.

6 Prosedur kerja

6.1 Ekstraksi DNA dengan metoda *phenol*

- a) Hancurkan jaringan target (0,2 g) dengan cara menambahkan 300 µl akuades steril, 30 µl proteinase K dan 30 µl RNase dalam *microtube* 1,5 ml dengan menggunakan *pestle*.
- b) Tambahkan 30 µl 1 % *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) ke *microtube* a), campurkan hingga merata dengan menyetil perlahan.
- c) Inkubasikan pada suhu 37 °C selama 15 menit.
- d) Tambahkan 400 µl *saturated phenol*, campurkan dengan bantuan *vortex* selama 1 menit.
- e) Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang.
- f) Pindahkan supernatan ke dalam *microtube* baru.
- g) Tambahkan 400 µl *saturated phenol*, campurkan dengan bantuan *vortex* selama 1 menit.
- h) Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang.
- i) Pindahkan supernatan ke dalam *mikrotube* baru.
- j) Tambahkan 400 µl *chloroform-isoamyl alcohol*, campur dengan bantuan *vortex*.
- k) Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang.
- l) Pindahkan 300 µl supernatan ke dalam *microtube* baru.
- m) Tambahkan 30 µl sodium asetat dan 750 µl alkohol absolut, campurkan dengan menyetil perlahan.
- n) Simpan pada *freezer* selama 1 jam.
- o) Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang.
- p) Buang supernatan, tambahkan 1.500 µl alkohol 75 %, campurkan dengan menyetil perlahan.
- q) Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang.
- r) Buang supernatan, tambahkan 1.200 µl alkohol absolut, campurkan dengan menyetil perlahan.
- s) Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang.
- t) Buang alkohol dan keringkan dalam desikator atau inkubator suhu 60 °C selama 5 menit - 10 menit.
- u) Setelah kering, tambahkan 50 µl - 200 µl akuades steril dan DNA siap digunakan.

6.2 Reaksi PCR untuk deteksi WSSV

Komposisi larutan PCR untuk mendeteksi WSSV (25 µl/reaksi) dibuat dengan mencampurkan bahan-bahan sebagai berikut:

Tabel 1 - Komposisi larutan PCR untuk mendeteksi WSSV

No	Larutan	Satuan ukuran	Jumlah
1.	Akuabides steril	µl	19,125
2.	10 x PCR <i>buffer</i>	µl	2,5
3.	MgCl ₂	µl	0,75
4.	dNTP <i>mix</i>	µl	0,5
5.	<i>Primer</i> 146F1/146R1	µl	0,5
6.	<i>Primer</i> 146F2/146R2	µl	0,5
7.	<i>taq</i> DNA <i>polymerase</i>	µl	0,125
8.	<i>template</i> DNA	µl	1
Total volume		µl	25

- Siapkan bahan 1,1 x jumlah sampel.
- Campurkan semua bahan kecuali *template* DNA, bagikan ke dalam *microtube* 0,2 ml dengan volume masing-masing 24 µl.
- Tambahkan *template* DNA, termasuk kontrol negatif dan kontrol positif.
- Atur suhu pada *thermal cycler* sebagai berikut:
 - pada *step* 1, *thermal cycler* diatur dengan *hot start* 95 °C selama 5 menit, suhu *denaturasi* 95 °C selama 30 detik, suhu *annealing* 52,5 °C selama 30 detik, suhu *extention* 72 °C selama 1,5 menit. Proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus. Kemudian dilanjutkan dengan *extra extention* pada suhu 72 °C selama 5 menit. Setelah proses selesai sampel disimpan pada suhu 4 °C;
 - pada *step* 2, *thermal cycler* diatur dengan *hot start* 95 °C selama 5 menit, suhu *denaturasi* 95 °C selama 30 detik, suhu *annealing* 54 °C selama 30 detik, suhu *extention* 72 °C selama 1 menit. Proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus. Kemudian dilanjutkan dengan *extra extention* pada suhu 72 °C selama 5 menit. Setelah proses selesai sampel disimpan pada suhu 4 °C. Pada *step* kedua ini sebagai *template* DNA diambil 1 µl dari produk *step* pertama.

6.3 Reaksi PCR untuk deteksi IHNV

Komposisi larutan PCR untuk mendeteksi IHNV (25 µl/reaksi) dibuat dengan mencampurkan bahan-bahan sebagai berikut:

Tabel 2 - Komposisi larutan PCR untuk mendeteksi IHNV

No	Larutan	Satuan ukuran	Jumlah
1.	Akuabides steril	µl	19,125
2.	10 x PCR <i>buffer</i>	µl	2,5
3.	MgCl ₂	µl	0,75
4.	dNTP <i>mix</i>	µl	0,5
5.	<i>primer</i> 389F	µl	0,5
6.	<i>primer</i> 389R	µl	0,5
7.	<i>taq</i> DNA <i>polymerase</i>	µl	0,125
8.	<i>template</i> DNA	µl	1
Total volume		µl	25

- Banyaknya bahan yang dipersiapkan adalah 1,1 x jumlah sampel.
- Setelah semua bahan dicampur, kecuali *template* DNA, bagikan ke dalam *microtube* 0,2 ml dengan volume masing-masing 24 µl.

- c) Tambahkan *template* DNA, termasuk kontrol negatif dan kontrol positif.
- d) Atur suhu pada *thermal cycler* sebagai berikut:
 - *thermal cycler* diatur dengan *hot start* 95 °C selama 5 menit, suhu denaturasi 95 °C selama 30 detik, suhu *annealing* 55 °C selama 30 detik, suhu *extention* 72 °C selama 1 menit. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 siklus. Kemudian dilanjutkan dengan *extra extention* pada suhu 72 °C selama 7 menit. Setelah proses selesai sampel disimpan pada suhu 4 °C.

6.4 Pembacaan produk PCR pada agarose

6.4.1. Elektroforesis

- a) Masukkan 2 % gel *agarose* ke dalam elektroforesis *chamber*.
- b) Tambahkan larutan TBE ke dalam elektroforesis hingga gel *agarose* terendam.
- c) Ambil sampel hasil PCR sebanyak 5 µl dan ditambah dengan *loading buffer* sebanyak 1 µl, campur dengan baik, kemudian disuntikkan ke dalam lubang sumuran dengan menggunakan mikropipet disertakan juga kontrol positif, kontrol negatif dan *marker* DNA masing-masing sebanyak 1 µl.
- d) Setelah semua sampel disuntikkan, pasang tutup elektroforesis dan hidupkan listrik dengan voltase diatur 150 V.
- e) Hentikan proses setelah 30 menit.

6.4.2. Pembacaan hasil

- a) Gel *agarose* kemudian direndam dalam larutan *ethidium bromide* (5 µg/ml) selama 5 menit.
- b) Selanjutnya gel *agarose* direndam dalam akuades selama 10 menit untuk menghentikan proses pewarnaan.
- c) Gel *agarose* diamati di atas UV *transilluminator*:
 - hasil positif WSSV bila terlihat perpendaran pita DNA dengan ukuran 1447 bp (*step* 1) atau 941 bp (*step* 2);
 - hasil negatif WSSV bila tidak terlihat perpendaran pita DNA dengan ukuran 1447 bp atau 941 bp;
 - hasil positif IHHNV bila terlihat perpendaran pita DNA dengan ukuran 389 bp;
 - hasil negatif IHHNV bila tidak terlihat perpendaran pita DNA dengan ukuran 389 bp atau 941 bp.
- d) Dokumentasikan hasil.

Lampiran A (normatif) Penyiapan reagensia

A.1 Pembuatan 10 % Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)

Cara membuat:

- larutkan 100 g SDS *elektroforesis grade* ke dalam 900 ml akuades;
- panaskan pada suhu 68 °C untuk melarutkan SDS;
- atur pH 7,2 dengan menambahkan beberapa tetes HCl pekat;
- tambahkan akuades hingga 1 l dan masukkan ke dalam botol reagen;
- sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C;
- untuk membuat 1 % SDS, tambahkan 1 bagian 10 % larutan SDS dengan 9 bagian akuades.

A.2 Pembuatan 3 M sodium acetat pH 5,2

Cara membuat:

- larutkan 408,1 g sodium asetat 3H₂O dalam 800 ml akuades;
- atur pH menjadi 5,2 dengan asam asetat glasial;
- tambahkan akuades sampai 1 l;
- bagi dalam beberapa botol;
- sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.

A.3 Pembuatan 1 M Tris-HCl pH 7,4

Cara membuat:

- larutkan 121,1 g *tris base* dalam 800 ml akuades;
- atur pH dengan menambahkan 70 ml HCl pekat;
- biarkan larutan dingin pada suhu kamar sebelum pengaturan pH terakhir;
- tambahkan akuades hingga 1 l;
- bagi dalam beberapa botol;
- sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.

A.4 Pembuatan larutan *saturated phenol*

Cara membuat:

- cairkan 100 g *phenol* dengan meletakkannya di dalam *waterbath* 65 °C;
- phenol* yang sudah cair ditampung dalam *separating funnel*;
- tambahkan dengan 20 ml akuades dan 40 ml 2 M Tris-HCl pH 7,4, kemudian dihomogenkan;
- diamkan dan setelah terpisah fase air dibuang;
- selanjutnya tambahkan lagi 20 ml Tris-HCl 2 M pH 7,4, dan dihomogenkan;
- diamkan dan setelah terpisah fase air dibuang;
- tambahkan 12,5 ml M-cresol, 0,5 ml 2-mercaptoethanol, 250 mg 8-hydroxyquinoline dan 20 ml Tris-HCl M pH 7,4;

- h) simpan larutan di dalam botol gelap;
- i) buang larutan bila telah berubah menjadi kemerahan.

A.5 Pembuatan 0,5 M EDTA pH 8

Cara membuat:

- a) tambahkan 186,1 gr *disodium ethylene diamine tetra acetate-2 H₂O* dalam 800 ml akuades, aduk dengan *magnetic stirrer*;
- b) atur pH hingga 8 dengan menambahkan NaOH (\pm 20 gr NaOH *pellet*);
- c) sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.

A.6 Pembuatan *buffer* TBE (*Tris Boric* EDTA) 5 x

Cara membuat:

- a) masukkan 800 ml akuades ke dalam *beaker glass* berkapasitas 1 l;
- b) timbang 54 g *tris base* dan 27,5 g *boric acid*;
- c) masukkan keduanya ke dalam *beaker glass* yang telah berisi akuades dan aduk dengan *magnetic stirrer* hingga larut;
- d) masukkan 20 ml 0,5 M EDTA, aduk sampai tercampur rata;
- e) tambahkan akuades sampai 1 l;
- f) masukkan dalam botol reagen dan sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C;
- g) untuk membuat larutan siap pakai yang mengandung 0,045 M *Tris boric* dan 0,001 M EDTA, larutkan 2 bagian larutan stok dengan 8 bagian akuades.

A.7 Pembuatan *ethidium bromide* (10 mg/ml)

Cara membuat:

- a) tambahkan 1 g *ethidium bromide* ke dalam 100 ml akuades;
- b) aduk dengan *magnetic stirrer* sampai *ethidium bromide* terlarut;
- c) bungkus tabung dengan *alluminium foil* atau pindahkan ke dalam botol gelap dan simpan pada suhu kamar.

A.8 Pembuatan 2 % gel agarose

Cara membuat:

- a) *agarose* ditimbang sebanyak 2 g dan ditambah dengan 1 x larutan TBE;
- b) goyang-goyang larutan dan biarkan selama 1 menit;
- c) panaskan sampai larutan menjadi bening;
- d) larutan dibiarkan hingga suhu 60 °C, kemudian dituang ke dalam cetakan gel yang telah disiapkan;
- e) untuk cetakan yang dapat menampung 8 sampel dituangkan sebanyak 15 ml dan untuk cetakan yang dapat menampung 17 sampel dituangkan sebanyak 30 ml;
- f) biarkan dingin selama 30 menit dan gel siap digunakan.











BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.or.id